

## CONTROLE BIOLÓGICO DE *Mycosphaerella fragariae* NA CULTURA DO MORANGUEIRO

Anderson Luis Heling<sup>1\*</sup>; Odair José Kuhn<sup>2</sup>; José Renato Stangarlin<sup>3</sup>

SAP 9544      Data envio: 11/03/2014      Data do aceite: 15/05/2014  
Scientia Agraria Paranaensis – SAP;    ISSN: 1983-1471  
Marechal Cândido Rondon, v. 14, n. 4, out./dez., p. 221-228, 2015

**RESUMO** - A Mancha de *Mycosphaerella* é uma das principais doenças foliares da cultura do morangueiro, podendo ocupar grandes proporções de área foliar e desta maneira reduzindo a área fotossintetizante. Seu controle se dá principalmente pelo uso de fungicidas químicos, porém, devido à crescente demanda por alimentos livres do uso de agrotóxicos, é que se tem pesquisado métodos alternativos de controle, como o controle biológico de doenças. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de plantas de morangueiro com os agentes de controle biológico *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a severidade de *Mycosphaerella fragariae*, a produtividade das plantas tratadas e a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanases, peroxidases e quitinases. Observou-se que aplicações de *S. cerevisiae* e *B. cereus* tiveram resultados semelhantes ao fungicida para controle da doença; porém, mesmo controlando o desenvolvimento da doença, isto não significou acréscimo na produtividade; e os diferentes agentes de controle utilizados não causaram alterações nos mecanismos de defesa avaliados.

**Palavras-chave:** controle alternativo, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

### *Biological control of Mycosphaerella fragariae in strawberry culture*

**ABSTRACT** - The *Mycosphaerella* spot is one of the main foliar diseases of strawberry, degrading great leaf regions and reducing the photosynthetic area. Its control is mainly by the use of chemical fungicides, but, due the increasing demand for food free of pesticide, alternative control methods have been researched, such as biological control. This work aimed to evaluate the effect on strawberry plants, treated with the biological control agents *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* and *Saccharomyces cerevisiae*, in the severity of *Mycosphaerella fragariae*, productivity and in the activity of  $\beta$ -1.3 glucanases, peroxidases and chitinases enzymes. It was verified that *S. cerevisiae* and *B. cereus* treatments were similar to fungicide for disease control. However, even reducing the severity of the disease, there was no increase in productivity, and the different control agents do not cause changes in the evaluated defense mechanisms.

**Key words:** alternative control, *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii*, *Saccharomyces cerevisiae*.

<sup>1</sup>Mestrando em Agronomia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon, PR. E-mail: [andersonheling@agronomo.eng.br](mailto:andersonheling@agronomo.eng.br). \*Autor para correspondência

<sup>2</sup>D. Sc., Professor Adjunto, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon/PR. E-mail: [ojkuhn@gmail.com](mailto:ojkuhn@gmail.com)

<sup>3</sup>D. Sc., Professor Associado, Centro de Ciências Agrárias - CCA, Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Campus Marechal Cândido Rondon/PR. E-mail: [jose.stangarlin@unioeste.br](mailto:jose.stangarlin@unioeste.br)

## INTRODUÇÃO

O morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.) é uma planta frutífera pertencente à família Rosaceae (CRONQUIS, 1988), sendo esta uma híbrida resultante do cruzamento natural das espécies de origem americanas *F. chiloensis*, *F. virginiana* e *F. ovalis*, e da espécie de origem européia *Fragaria vesca* (OLIVEIRA et al., 2006).

A produção de morango se destaca pela alta rentabilidade por área e pela sua demanda intensa de mão-de-obra (OLIVEIRA; SIVITTARO, 2009). De um modo geral, o morangueiro é cultivado em pequenas propriedades, sendo de grande importância para a fixação do homem no campo e para a geração de renda e emprego no meio rural (REICHERT; MADAIL, 2003). Normalmente, seu cultivo se dá em áreas de 0,5 a 1,0 ha, gerando empregos para três pessoas/ha/ano (RIGON et al., 2005).

Para uma boa produtividade e qualidade de frutos é necessário haver um bom controle de pragas e doenças na cultura, destacando-se este segundo como sendo de grande importância.

Dentre as doenças que ocorrem na cultura do morangueiro a Mancha de *Mycosphaerella*, ocasionada pelo fungo *Mycosphaerella fragariae*, é a que se destaca, devido a sua alta incidência e perdas de produtividade ocasionadas (COSTA; VENTURA, 2006).

De acordo com Tanaka et al. (2005), a Mancha de Micosferela (*Mycosphaerella fragariae*) é a doença foliar de ocorrência mais generalizada, encontrada em quase todas as regiões onde se cultiva o morango. A redução na área fotossintetizante provocada pelas manchas pode ser responsável por perdas da ordem de 10% a 100%, dependendo da suscetibilidade da variedade e das condições ambientais.

Sua prevenção e controle podem ser realizados de diversas maneiras, dentre essas, pelo uso de agentes de controle biológico. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do tratamento de plantas de morangueiro com os agentes de controle biológico *Bacillus cereus*, *Saccharomyces boulardii* e *Saccharomyces cerevisiae*, sobre a severidade de *M. fragariae*, a produtividade das plantas tratadas e a atividade das enzimas  $\beta$ -1,3 glucanases, peroxidases e quitinases.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Horticultura e Cultivo Protegido "Professor Mário César Lopes", pertencente à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Campus Marechal Cândido Rondon, situado a latitude 24°33'29"S e longitude 54°02'44"O.

Utilizou-se a cultivar de morangueiro Camarosa, sendo as mudas obtidas de cultivo localizado na Estação Experimental Prof. Dr. Antônio Carlos dos Santos Pessoa, estação esta pertencente à Universidade Estadual do Oeste

do Paraná, localizada no município de Marechal Cândido Rondon, situado a latitude 24°31'59"S e longitude 54°01'18"O. O transplante das mudas foi realizado no dia 7 de maio de 2012.

Para a realização do experimento foram utilizados vasos plásticos de 8 L, contendo substrato obtido através da mistura de solo, areia e matéria orgânica, na proporção de 2:2:1 v:v:v (2 partes de solo: 2 parte de areia lavada de granulometria fina: 1 de composto de húmus de minhoca).

Os vasos ficaram sobre o solo e cobertos por tela de sombreamento (35%) a uma altura de 0,6 m do solo.

O delineamento experimental foi em esquema simples, em blocos casualizados, contendo cinco tratamentos, com cinco parcelas e cada parcela com cinco plantas.

## Tratamentos

Os tratamentos utilizados foram: testemunha, a qual não recebeu agente de controle; tratamento controle, no qual se aplicou fungicida químico tendo como princípio ativo Azoxistrobina + Ciproconazole; tratamento com suspensão de células de *Saccharomyces cerevisiae*; tratamento com suspensão de células de *Saccharomyces boulardii*; e tratamento com suspensão de células de *Bacillus cereus*.

As leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foram obtidas a partir do fermento biológico de panificação Fleischmann® e do medicamento Floratil® respectivamente, e foram colocadas para desenvolver-se em meio de cultura líquido YEPG, contendo: 20 g de extrato de levedura, 20 g de peptona e 10 g de glicose em 1 L de água destilada. Deste meio 100 mL foram transferidos para erlenmeyers de capacidade de 250 mL, vedados e em seguida autoclavados a 121 °C e 1 atm por 20 min, após este processo se deixou o meio esfriar e então foram repicadas as leveduras que se desejava cultivar. Em seguida os meios de cultivo foram levados a incubadora com agitação orbital e mantidos em constante agitação a 100 rpm, por um período de sete dias. Após este período, os meios foram retirados da incubadora e em seguida centrifugados a uma rotação de 2300 rpm por 5 min, então o sobrenadante foi descartado obtendo-se uma massa de células, da qual foram retiradas as doses para os tratamentos. Este processo de obtenção de células de leveduras era realizado sempre antes das aplicações, de modo que a cada aplicação eram produzidas novas células de leveduras.

A obtenção de *B. cereus* também se deu através de cultivos efetuados no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Esta bactéria foi cultivada em placas de Petri contendo meio de cultivo ágar-nutriente, o qual foi composto por 20 g de ágar bacteriológico, 5 g de extrato de carne e 3 g de peptona em 1 L de água destilada. Sendo esterilizados a 121 °C e 1 atm por 20 min. Após vertido o meio em placas de petri, células de *B. cereus* foram transferidas para as placas com auxílio de uma alça de platina em câmara de fluxo laminar

e mantidas em temperatura ambiente por 48 h. A suspensão de células foi preparada a partir da lavagem das placas com água destilada, calibrando-se a mesma com auxílio de espectrofotômetro para um volume de  $10^8$  UFC (unidades formadoras de colônias), calculada com base em curva de concentração bacteriana previamente preparada para calibração.

As aplicações dos tratamentos foram realizadas por pulverizações manuais realizadas via aérea sob as plantas cultivadas, estas aplicações foram iniciadas em 10 de julho de 2012 e a partir desta data foram repetidas de forma quinzenal até o fim da frutificação a qual ocorre em 15 de janeiro de 2013.

As doses empregadas para cada tratamento foram: para o tratamento controle 80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole; para *S. cerevisiae* e *S. boulardii* foram utilizadas 2 g L<sup>-1</sup>; e para o *B. cereus* a dose empregada foi de suspensão de células a  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, sendo aplicado volume de calda de 10 mL planta<sup>-1</sup>.

O patógeno, *M. fragariae*, fungo causador da Mancha de Micosferela ocorreu através da infecção natural.

### Avaliações

No decorrer do experimento foram realizadas cinco avaliações, sendo a primeira delas no mês de maio de 2012 (0 dias após o transplante (0 DAT)), a segunda no mês de julho de 2012 (72 DAT), a terceira no mês de setembro de 2012 (123 DAT), a quarta no mês de novembro de 2012 (184 DAT) e a última no mês de Janeiro de 2013 (263 DAT).

Dentre das análises de severidade de doença foram avaliadas a área foliar lesionada e a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD).

A área foliar lesionada foi determinada com o auxílio do programa Bricscad<sup>TM</sup>, para isto os folíolos foram dispostos sobre uma bancada e cobertos com uma placa de vidro de modo que todos os folíolos ficassem expostos e abertos, na placa de vidro foi marcada uma linha reta com 5 cm de extensão, fotografou-se com câmera fotográfica digital. As imagens foram processadas no sistema computacional Bricscad<sup>TM</sup>, determinando-se a área foliar total, após finalizar o processo de avaliação de área foliar, marcaram-se as lesões foliares nas imagens e em seguida determinando-se a área marcada.

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi determinada através da metodologia proposta por Shaner e Finney (1977), para tanto, os dados foram transformados de área lesionada para porcentagem de área lesionada caracterizando assim severidade.

Dentre das análises bioquímicas foram avaliadas as variáveis proteínas totais, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases e peroxidases.

Para a realização destas avaliações, inicialmente foi necessário que em cada avaliação se coletasse um folíolo de cada planta dos diferentes tratamentos. Após a coleta dos folíolos, estes eram transportados imediatamente para o Laboratório de Fitopatologia onde foram pesados, embalados, identificados e congelados a

temperatura de -20 °C, posteriormente, destes folíolos foram obtidos os extratos protéicos.

Na obtenção dos extratos protéicos, as amostras de folíolos congelados foram homogeneizadas mecanicamente em 7 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0), com o auxílio de almofariz de porcelana previamente resfriada. O homogenato foi centrifugado a 20.000 g durante 20 min a 4 °C, sendo que o sobrenadante obtido foi considerado como extrato enzimático. Este extrato enzimático foi congelado a -20 °C e posteriormente utilizado para a determinação de proteínas, atividade de quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases e peroxidases, sendo que sempre antes destas avaliações o extrato protéico era descongelado em caixa de isopor contendo gelo (KUHN, 2007).

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Bradford (1976), sendo que para cada amostra se utilizou 600  $\mu$ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), 200  $\mu$ L de preparado enzimático e 200  $\mu$ L de reagente Bradford (250 mg de corante Coomassine Brilliant Blue G-250, 125 mL de etanol, 125 mL de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) e 125 mL de água destilada). O reagente Bradford foi adicionado sob agitação e posteriormente às amostras foram incubadas por 5 min, então se efetuou a leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Cada amostra foi composta por três réplicas. Na prova em branco se utilizou 800  $\mu$ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu$ L de reagente Bradford, sendo esta amostra em branco utilizada para a calibração do espectrofotômetro A absorbância foi plotada em curva padrão para proteína ( $y = 0,0299x + 0,0596$ , onde y é a absorbância a 595 nm e x a concentração de proteína ( $\mu$ g)).

A avaliação da atividade de quitinases foi realizada conforme a metodologia descrita por Wirth e Wolf (1990), na qual ocorre a liberação de fragmentos solúveis de quitina carboximetilada marcada com remazol brilhante violeta (CM-Chitin-RBV). Para tanto, 100  $\mu$ L do extrato protéico foram adicionados a 700  $\mu$ L do tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu$ L de CM-chitinRBV. Então estas amostras foram incubadas em banho-maria a 40 °C por 20 min, após a incubação a reação foi paralisada com a adição de 200  $\mu$ L de solução de HCl 1 M, seguida de resfriamento em gelo por 10 min e centrifugação a 9.500g por 6 min. Para o controle foram utilizados 800  $\mu$ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu$ L de CM-chitinRBV. O tampão consistiu na utilização de 1 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). O sobrenadante foi transferido para cubeta de vidro para determinar a absorbância em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram obtidos descontando-se os valores de absorbância do controle dos valores de absorbância das amostras, sendo os valores expressos em Unidade de Enzima por minuto por grama de proteína. Foi considerado uma unidade de enzima a variação na absorbância em 0,001.

A determinação de  $\beta$ -1,3 glucanases foi realizada conforme a metodologia utilizada por Kuhn (2007), Para tanto as amostras foram preparadas com 100  $\mu$ L de extrato enzimático, 50  $\mu$ L de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 150  $\mu$ L de laminarina. O controle foi composto por 100  $\mu$ L de extrato enzimático e 50  $\mu$ L de tampão fosfato 0,01 M

(pH 6,0). A prova em branco foi constituída de 150 µL de laminarina e de 150 µL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). A laminarina foi utilizada na concentração de 2 mg mL<sup>-1</sup> de água destilada. As soluções (amostra, controle e prova em branco) foram deixadas em banho-maria a 40 °C por 1 h, em seguida adicionou-se 150 µL de laminarina no controle, então as soluções foram transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 1,5 mL de PAHBAH (0,5 %), então deixou-se os tubos de ensaio em banho-maria a 100 °C por 10 min, em seguida estes foram resfriados em gelo, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 410 nm em cubetas de vidro, sendo o espectrofotômetro calibrado com a prova em branco, a atividade de β-1,3 glucanases constituiu na diferença ente a absorbância da mistura contendo amostra e do controle, as quais foram plotadas na curva padrão para glicose ( $y = 0,002x + 0,0046$ , onde y é a absorbância a 410 nm e x a concentração de açúcares redutores (µg)) e expressa em equivalente µg de glicose por minuto por mg de proteína.

A determinação da atividade de peroxidase foi realizada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto (HAMMERSCHMIDT et al., 1982). A mistura da solução foi composta de 2,8 mL de substrato para enzima e 0,2 mL de extrato enzimático. O substrato para enzima foi composto por 306 µL de peróxido de hidrogênio p.a., 12,5 mL de guaiaicol 2 % e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0). Em seguida foi efetuada a leitura em espectrofotômetro a 470 nm pelo período de 2 min, sendo os resultados expressos em unidade de enzima por minuto por mg de proteína.

Dentre das análises de produção foram avaliadas as variáveis de número de frutos por planta, peso dos frutos e produtividade total por planta.

A avaliação de número de frutos por plantas consistiu na contabilidade do total de frutos produzidos por uma única planta ao longo do ciclo.

Para avaliação do peso dos frutos, estes assim que colhidos eram transportados ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual do Oeste do Paraná e pesados em balança de precisão, sendo os valores expressos em gramas.

A produtividade total por planta se obteve através da soma dos pesos de todos os frutos colhidos de uma planta, expressando-se os valores em gramas planta<sup>-1</sup>.

Para a realização das análises estatísticas empregou-se o programa estatístico SISVAR versão 5.3 (FERREIRA, 2011), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey, em nível de 5% de significância.

## RESULTADO E DISCUSSÕES

Com relação às variáveis área foliar lesionada (Tabela 1) e AACPD (Figura 1), pode-se observar que os tratamentos com *S. cerevisiae* e *B. cereus* foram semelhantes ao tratamento controle, sendo estes, superiores a testemunha, e com efeito de controle da Mancha de Micosferela. Já o tratamento com *S. bouldarii* não se diferenciou estatisticamente, nem da testemunha e nem dos demais tratamentos aplicados.

Para a proporção da área foliar das plantas de morangueiro lesionadas por *M. fragariae*, tratadas com diferentes agentes de controle biológico (Tabela 1), pode-se observar que ao final do ciclo da cultura, 263 DAT, os tratamentos *S. cerevisiae*, *B. cereus*, controle e *S. bouldarii* apresentaram redução da severidade dos sintomas de 53,05%, 49,59%, 49,71% e 33,16% respectivamente, quando comparados com a testemunha, sendo que para os três primeiros a redução foi significativa.

**TABELA 1.** Proporção de área foliar (%) de plantas de morangueiro lesionadas por *Mycosphaerella fragariae*, submetidas a diferentes agentes de controle biológico, em diferentes períodos de avaliação. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013.

Tratamentos	Avaliações – Área foliar lesionada (%)				
	0 DAT <sup>1</sup>	72 DAT	123 DAT	184 DAT	263 DAT
Testemunha	0 a <sup>2</sup>	0,054 a	0,440 a	1,890 b	13,584 b
Controle <sup>3</sup>	0 a	0,046 a	0,424 a	1,016 a	6,832 a
<i>S. cerevisiae</i>	0 a	0,046 a	0,308 a	1,114 a	6,378 a
<i>S. bouldarii</i>	0 a	0,030 a	0,444 a	1,452 ab	9,080 ab
<i>B. cereus</i>	0 a	0,050 a	0,402 a	0,938 a	6,848 a
CV (%)	0	85,93	32,47	28,55	40,21
Média geral	0	0,045	0,404	1,282	8,544

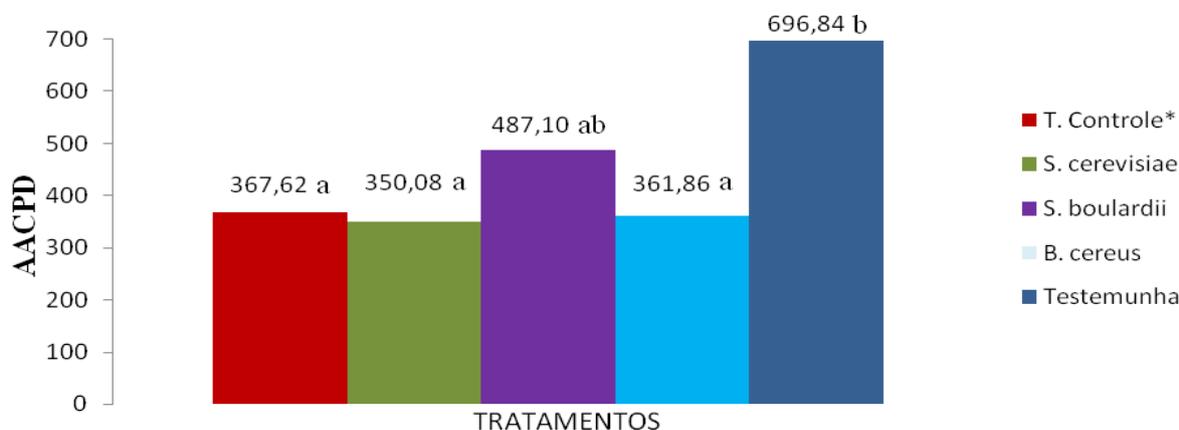
Nota: <sup>1</sup>DAT: Dias Após o Transplante; <sup>2</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; <sup>3</sup>80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole. Observação: início da aplicação dos tratamentos: 64 DAT.

Na avaliação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), representada na Figura 1, pode-se observar que, os resultados obtidos vem de encontro as observações de área foliar lesionada, sendo que os tratamentos que receberam aplicações de *S. cerevisiae* e de *B. cereus*, obtiveram área abaixo da curva semelhante à apresentada pelo tratamento controle e

redução desta em 49,76%, 48,07% e 47,24% respectivamente, quando comparadas com a testemunha, demonstrando assim efeito positivo no controle de *M. fragariae* com o uso destes dois microrganismos. Já o tratamento com aplicações de *S. bouldarii* apresentou redução de 30,10% em relação a testemunha, não se diferenciando dos demais tratamentos.

Gouvea et al. (2009), também trabalhando com a cultura do morangueiro, observaram que aplicação de *S. cerevisiae* não resultou no controle da Mancha de Micosferela, porém, para a Mancha de Dendrofoma (*Dendrophoma obscurans*) as aplicações de *S. cerevisiae* se mostraram eficientes no controle, reduzindo em 31,08%

a AACPD da incidência. Desta maneira pode-se analisar que os efeitos causados pela aplicação de *S. cerevisiae* sobre a cultura do morangueiro variam em função do patógeno atuante e das condições de temperatura e umidade para o desenvolvimento tanto dos patógenos quanto dos agentes de controle empregados.



**FIGURA 1** - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da Mancha de Micosferela em plantas de morangueiro, tratadas com diferentes agentes de controle biológico. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013. \*80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole.

A levedura *S. cerevisiae* vem sendo estudada como agente de controle biológico em outros patossistemas, Piccinin et al. (2005), em estudos conduzidos com a aplicação desta levedura na cultura do sorgo, observaram que plantas tratadas com esta levedura obtiveram redução na severidade de *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose. Mello et al. (2011), pesquisando o uso de leveduras para controle da podridão-mole causada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em couve-chinesa, observaram que a aplicação de *S. cerevisiae* reduziu a AACPD desta doença em 39,3% em casa de vegetação em 15,7% a campo.

Ao se analisar os dados obtidos com o desenvolvimento do experimento, com os relatos encontrados na literatura, pode-se observar que *S. cerevisiae* tem grande potencial no controle de patógenos de plantas, porém ainda deve se pesquisar mais a fundo as doses que devem ser empregadas para determinados patógenos e se estudar os ambientes e microclimas que favorecem e os que desfavorecem o desenvolvimento desta levedura.

Kuhn (2007) observou que plantas de feijoeiro tratadas com *B. cereus* tiveram induzida a resistência contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Além disto, este autor também verificou que *B. cereus* teve efeito no controle do mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum*, apresentando um controle de 10,5% a 50,5%, dependendo do número de aplicações realizadas. Silva et al. (2004) observaram em tomateiro induzido por *B. cereus*, isolados de solo rizosférico, aumento da resistência a patógenos como *Alternaria solani*, *Corynespora cassiicola*, *Oidium lycopersici*, *Stemphylium solani* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Com

isso pode-se observar que *B. cereus* tem possibilidades de controlar determinados patógenos em diferentes hospedeiros, além poder ser utilizado como indutor de resistência de plantas contra patógenos.

Com relação a *S. boulardii* ainda há poucos estudos sobre esta levedura no controle de doenças em plantas. Os resultados obtidos com a condução desta pesquisa nos mostram que esta levedura deve ser melhor estudada para sua aplicação no controle biológico de doenças em plantas, estudando-se doses a serem aplicadas, possíveis patógenos a serem controlados e ambiente que favorece e desfavorece seu desenvolvimento no filoplano.

Para as variáveis proteínas totais, quitinases,  $\beta$ -1,3 glucanases e peroxidases (Figura 2), de morangueiros tratados com diferentes agentes de controle biológico da *M. fragariae*, observou-se que não houve alterações significativas em nenhuma das avaliações e para nenhum dos tratamentos aplicados.

Gouvea et al. (2009), pesquisando o controle de doenças foliares e de flores em morangueiros tratados com *S. cerevisiae*, observaram que a atividade de quitinase de plantas tratadas não diferiu do tratamento testemunha, da mesma maneira como se constatou nesta pesquisa, porém para atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases, os autores constataram que, plantas tratadas com células de *S. cerevisiae* tem atividade superior a testemunha 24 h após a aplicação e que, em 168 h após a aplicação a testemunha apresenta maior atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases, mostrando assim, uma grande variação na atividade desta enzima.

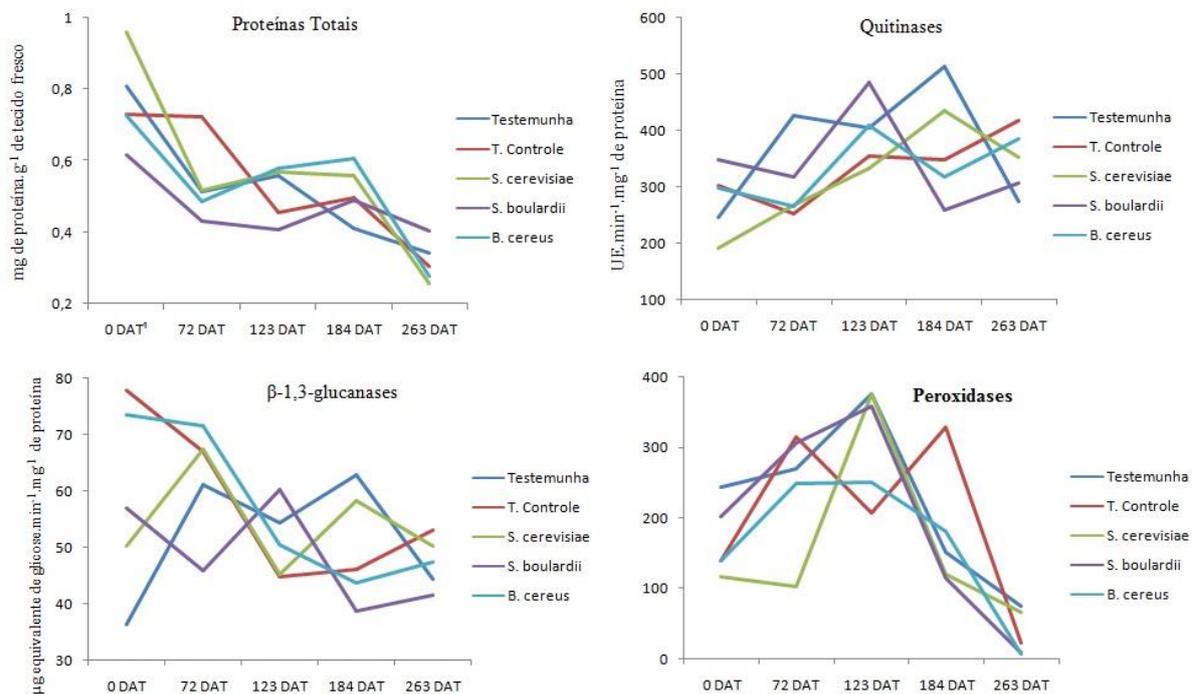
Outros autores, assim como Silva et al. (2004), estudando a indução de resistência sistêmica em plantas de tomate por rizobactérias, observaram que plantas inoculadas a partir de sementes microbiolizadas obtiveram

maior atividade das enzimas peroxidases. Bargabus et al. (2003), pesquisando o sistema defensivo de beterraba sacarina, observou que plantas tratadas com acibenzolar-S-metílico e por *B. mycoides* vivas apresentaram maiores atividades das enzimas peroxidases,  $\beta$ -glucanases e quitinases quando comparadas com tratamentos que receberam *B. mycoides* não vivas e com a testemunha que recebeu apenas água.

Desta maneira, pode-se observar que os organismos aplicados como tratamentos no controle de *M. fragariae*, nas condições avaliadas, não causaram efeitos nas atividades das enzimas avaliadas (Figura 2).

Para as variáveis número de frutos por planta, peso dos frutos e produtividade total por planta, iniciaram-se suas avaliações a partir dos 123 DAT, já que até então as plantas ainda não haviam produzido frutos. Pode-se observar que os tratamentos com os microrganismos aplicados sobre as plantas de morangueiro não tiveram alterações sobre a produção de frutos.

Na Tabela 2 pode-se observar que os valores médios de frutos produzidos por plantas de morangueiro tratadas com diferentes agentes de controle biológico, não apresentaram alterações significativas, para nenhum dos tratamentos e em nenhuma das avaliações.



**FIGURA 2** - Valores médios de proteínas totais (mg de proteína.g<sup>-1</sup> de tecido fresco); atividade de quitinases (UE.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína); atividade de  $\beta$ -1,3 glucanases ( $\mu$ g equivalente de glicose.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína); e de atividade de peroxidases (UE.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> de proteína), de plantas de morangueiro submetidas a diferentes agentes para controle biológico de *Mycosphaerella fragariae*, em diferentes períodos de avaliação. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013. <sup>1</sup>Dias Após Transplante. Observação: início da aplicação dos tratamentos: 64 DAT; UE: Unidade de Enzima = Unidade de Absorbância. Para atividade de Peroxidases dados transformados por  $(X+0,5)^{0,5}$ .

Com relação à avaliação do peso médio de frutos (Tabela 3), pode-se observar que, somente na segunda avaliação, realizada aos 184 DAT foi observado que a média obtida pelo tratamento controle foi superior aos demais tratamentos, porém na terceira avaliação, aos 263 DAT, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos.

Para a avaliação de produtividade de frutos por planta de morangueiro (Tabela 4), tratadas com diferentes agentes de controle biológico, pode-se observar que não houve alterações significativas. Pode-se atribuir a não ocorrência de diferença significativa ao alto coeficiente de variação apresentado.

Os dados obtidos com a condução deste experimento também nos mostram uma tendência de que

plantas tratadas com *S. cerevisiae* tendem a ser mais produtivas, porém isto não ficou evidente nos resultados obtidos e o provável motivo disto é o alto nível do coeficiente de variação apresentado, já que em todas as avaliações realizadas o tratamento com *S. cerevisiae* apresentou média maior que os demais tratamentos e das testemunhas, porém não foi o suficiente para alterar a média de maneira significativa. Para Kuhn (2007), trabalhando com indução de resistência na cultura do feijoeiro, observou que aplicações de *B. cereus* não refletiram em alterações significativas na produtividade deste. Assim como Müller (2011), que pesquisando indução de resistência em feijoeiro por aplicações de *S. boulardii*, observou que aplicações desta levedura não causaram alteração nas variáveis número de vagens por

planta, número de grãos por vagem, massa de 100 grãos e produtividade, para todas estas variáveis, os resultados não

foram significativos estatisticamente.

**TABELA 2.** Frutos produzidos por planta de morangueiro (frutos planta<sup>-1</sup>), submetidas a diferentes agentes de controle biológico de *Mycosphaerella fragariae*, em diferentes períodos de avaliação. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013.

Avaliações - Frutos por planta (frutos planta <sup>-1</sup> )						
Tratamentos	123 DAT <sup>1</sup>		184 DAT		263 DAT	
Testemunha	4,87	a <sup>2</sup>	10,67	a	16,87	a
Controle <sup>3</sup>	4,73	a	10,33	a	14,93	a
<i>S. cerevisiae</i>	5,40	a	11,80	a	17,60	a
<i>S. boulardii</i>	5,13	a	11,13	a	17,33	a
<i>B. cereus</i>	5,20	a	10,80	a	17,40	a
CV (%)	17,30		16,67		12,46	
Média geral	5,067		10,947		16,827	

Nota: <sup>1</sup>DAT: Dias Após o Transplante; <sup>2</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; <sup>3</sup>80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole. Observação: início da aplicação dos tratamentos: 64 DAT.

**TABELA 3.** Massa de frutos (g), produzidos por plantas de morangueiro, submetidas a diferentes agentes de controle biológico de *Mycosphaerella fragariae*, em diferentes períodos de avaliação. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013.

Avaliações - Massa de frutos (g)						
Tratamentos	123 DAT <sup>1</sup>		184 DAT		263 DAT	
Testemunha	8,520	a <sup>2</sup>	8,040	ab	5,630	a
T. Controle <sup>3</sup>	9,098	a	9,187	a	6,682	a
<i>S. cerevisiae</i>	8,413	a	8,828	ab	7,262	a
<i>S. boulardii</i>	8,328	a	7,479	ab	6,466	a
<i>B. cereus</i>	8,923	a	5,714	b	6,158	a
CV (%)	17,39		22,23		19,07	
Média geral	8,657		7,850		6,440	

Nota: <sup>1</sup>DAT: Dias Após o Transplante; <sup>2</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; <sup>3</sup>80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole. Observação: início da aplicação dos tratamentos: 64 DAT.

**TABELA 4.** Produtividade (g.planta<sup>-1</sup>), de plantas de morangueiro, submetidas a diferentes agentes de controle biológico de *Mycosphaerella fragariae*, em diferentes períodos de avaliação. Marechal Cândido Rondon, 2012-2013.

Avaliações - Produtividade (g planta <sup>-1</sup> )						
Tratamentos	123 DAT <sup>1</sup>		184 DAT		263 DAT	
Testemunha	43,185	a <sup>2</sup>	88,770	a	123,526	a
T. Controle <sup>3</sup>	42,497	a	94,052	a	123,200	a
<i>S. cerevisiae</i>	46,543	a	103,400	a	144,596	a
<i>S. boulardii</i>	42,780	a	87,174	a	126,624	a
<i>B. cereus</i>	45,489	a	77,686	a	119,394	a
CV (%)	24,28		24,23		17,39	
Média geral	44,099		90,216		127,468	

Nota: <sup>1</sup>DAT: Dias Após o Transplante; <sup>2</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5 % de probabilidade; <sup>3</sup>80 mg L<sup>-1</sup> i.a. Azoxistrobina + 32 mg L<sup>-1</sup> i.a. Ciproconazole. Observação: início da aplicação dos tratamentos: 64 DAT.

Os dados obtidos com a condução deste experimento mostram que apesar dos tratamentos com aplicações de *S. cerevisiae* e *B. cereus* terem efeito de controlar *M. fragariae*, assim como o tratamento controle, estes não elevaram a produtividade das plantas tratadas.

Desta maneira pode-se analisar que os níveis de lesão foliar causados por *M. fragariae* não foram suficientes para causar perdas na produtividade da cultura,

evidenciando assim que, a cultura tolera níveis de até 13,5% sem que isto afete a produtividade. Sendo assim, a aplicação de controle neste nível de infecção e para as condições avaliadas é desnecessário, porque implica em custos, tanto para a aquisição de agente de controle, como para a aplicação deste, que demanda tempo e mão-de-obra. Caso o produtor opte pelo controle químico há riscos de contaminação do aplicador, do solo, da água e dos frutos

que serão posteriormente consumidos. Além disto, aplicações de fungicida químico sintéticos podem causar desequilíbrio no ambiente de produção, eliminando os microrganismos de ocorrência natural no sistema de produção e que são inimigos do patógeno, causando assim uma dependência futura no uso de produtos químicos para o controle de doenças.

## CONCLUSÕES

Morangueiros que receberam aplicações de *Saccharomyces cerevisiae* e *Bacillus cereus* obtiveram controle no desenvolvimento de *Mycosphaerella fragariae* semelhante estatisticamente aos morangueiros que receberam o Tratamento com fungicida.

Os diferentes tratamentos aplicados sobre as plantas de morangueiro não causaram alterações nos mecanismos de defesa analisados.

Os tratamentos *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus cereus* e Controle, apesar de reduzirem a severidade de *M. fragariae*, não elevaram a produtividade das plantas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARGABUS, R.L.; ZIDACK, N.K.; SHERWOOD, J.E.; JACOBSEN, B.J. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. n. 61, p. 289-298. 2003.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254. 1976.
- COSTA, H.; VENTURA, J.A.; Manejo integrado de doenças do morangueiro. In: SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO, 3, Pelotas, 2006. **Anais**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006. p. 17-28.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed. Bronx: The New York Botanical Garden, 1988. 555p.
- FERREIRA, D.F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042. 2011.
- GOUVEA, A.; KUHN, O.J.; MAZARO, S.M.; MIO, L.L.M.; DESCHAMPS, C.; BIASI, L.A.; FONSECA, V.C. Controle de doenças foliares e de flores e qualidade pós-colheita do morangueiro tratado com *Saccharomyces cerevisiae*. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 4, p. 527-533. 2009.
- HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E.M.; KUC, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**. London, v. 20, p. 73-82. 1982.
- KUHN, O.J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007. 140 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. 2007.
- MELLO, M.R.F.; SILVEIRA, E.B.; VIANA, I.O.; GUERRA, M.L.; MARIANO, R.L.R. Uso de antibióticos e leveduras para controle da podridão-mole em couve-chinesa. **Horticultura Brasileira**. v. 29, n. 1, p. 78-83. 2011.
- MÜLLER, S.F. **Custo adaptativo da indução de resistência por *Saccharomyces boulardii* em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. Marechal Cândido Rondon, 2011. 43 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2011.
- OLIVEIRA R.P.; SCIVITTARO W.B. Produção de frutos de morango em função de diferentes períodos de vernalização das mudas. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 1, p. 91-95. 2009.
- OLIVEIRA, R.P.; SOUZA, T.M.; SCIVITTARO, W.B. **Ventana: nova cultivar de morangueiro recomendada para o Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2006, 4p. (Comunicado Técnico, 138).
- PICCININ, E.; DI PIERO, R.M.; PASCHOLATI, S.F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**. v. 30, n. 1, p. 5-9. 2005.
- REICHERT, L.J.; MADAIL, J.C.M. Aspectos socioeconômicos. In: SANTOS, A.M.; MEDEIROS, A.R.M. (eds). **Morango Produção**. Frutas do Brasil, 40. Brasília: EMBRAPA CT. p. 12-15. 2003.
- RIGON, L.; CORRÊA, S.; REETZ, E.; VENCATO, A.; ROSA, G.R.; BELING, R.R. Pequenas frutas. **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2005**, Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta, v. 1, n. 1, p. 90-97. 2005.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**. v. 67, p. 1051-1056. 1977.
- SILVA, H.S.A.; ROMEIRO, R.S.; MACAGNAN, D.; HALFELD-VIEIRA, B.A.; PEREIRA, M.C.B.; MOUNTEER, A. Rhizobacterial induction of systemic resistance in tomato plants: non-specific protection and increase in enzyme activities. **Biological Control**, Orlando, v. 29, p. 288-295. 2004.
- TANAKA, M.A.S.; BETTI, J.A.; KIMATI, H. Doenças do Morangueiro. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas Cultivadas**. Quarta Edição. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 489-500.
- WIRTH, S.J.; WOLF, G.A. Dye-labeled substrates for the assay and detection of chitinase and lysozyme activity. **Journal of Microbiological Methods**. v. 12, p. 197-205. 1990.